Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 467- 482

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۱ ص.۴۸۲-۴۶۷

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil

Mohsen Ebrahimi Hemmati Kaykha[1], Hossein Jooyandeh[*2], Behrooz Alizadeh Behbahani[3], Mohammad Noshad[4]

Received: 2021.01.18
Revised: 2021.02.21
Accepted: 2021.04.20
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. (2022). Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 467-482.

Abstract

Introduction: Oxidative reactions are needed for human survival, but these reactions can sometimes be destructive. There is a lot of evidence that shows many disorders (neurological, renal, hepatic) and diseases such as cancer and vascular diseases, and even food spoilage are caused by oxidative reactions of free radicals. Some types of reactive oxygen species, such as oxygenated water, and free radicals such as hydroxyl and superoxide, can react with certain fats, nucleic acids, and proteins in the body to kill them. In general, any substance that delays or prevents the oxidation process is called an antioxidant. In various studies that have been done so far, the antioxidant and protective properties of the novel plants have been reported. Among other species of medicinal plants, the rosemary plant with the scientific name (*Rosmarinus officinalis* L.) belongs to the mint family, the leaves of which are used as an additive in many foods. This plant is cultivated in many parts of the world, including Iran, but the main habitat of this plant has been attributed to the shores of the Mediterranean Sea. The purpose of this study was to identify chemical compounds, antioxidant effects, total phenolic and flavonoids contents, and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil (ROEO) on colorectal cancer cell line (HT29) and identification of functional groups of ROEO using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Materials and methods: In the present study, the analysis of chemical compounds in ROEO was determined by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). The total phenolic and flavonoid content of ROEO was evaluated using Folin-Ciocalteu and colorimetry using aluminum chloride, respectively. Antioxidant properties of ROEO were evaluated by DPPH and ABTS methods. The cytotoxic effect of ROEO on colorectal cancer cell lines (HT29) was evaluated by MTT method. The compositions of the functional groups present in the essential oil were investigated using Fourier transform infrared spectroscopy.

---

1. MSc., Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
4. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(*Corresponding Author Email:hosjooy@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68369.1013

Results and discussion: The chemical analysis of ROEO comprised of 29 compounds, which composed 94.22% of total essential oil. The main compound identified in the essential oil used in this study was eucalyptol with 40.13%. Total phenolic content was 72.55 mg gallic acid per gram of essential oil and its flavonoid content was 36 mg QE/g. The ROEO antioxidant activity for both DPPH and ABTS tests were 78.74% and 81.97%, respectively. The results of cytotoxic effect of ROEO showed that the cytotoxic effect of ROEO was highly dependent on its concentration. The higher the concentration of essential oil, the higher the level of cytotoxicity. Fourier transform infrared spectroscopy analysis confirmed the presence of aldehyde compounds, ketones, carboxylic acids, esters and alkenes. The results of all ROEO tests showed that this essential oil can be used as a potential source in the pharmaceutical, food, cosmetic and health industries.

Key words: Essential oil, Gas chromatography, Fourier transform infrared spectroscopy, Free radical.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 467- 482

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۸۲-۴۶۷

مقاله علمی-پژوهشی

شناسایی ترکیبات شیمیایی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام فنل و فلاونوئید کل و سمیت سلولی اسانس رزماری

محسن ابراهیمی همتی کیخا[1]- حسین جوینده[2]*- بهروز علیزاده بهبهانی[3]- محمد نوشاد[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۹
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۱۲/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۳۱

چکیده

رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* L. گیاهی از تیره نعناعیان می‌باشد که به دلیل داشتن خواص‌های گوناگون از جمله خواص دارویی، پزشکی و طعم‌دهنده در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. در پژوهش حاضر ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل طیف‌سنج جرمی تعیین گردید. ارزیابی محتوای تام فنلی و فلاونوئید اسانس رزماری به‌ترتیب با استفاده از روش‌های فولین- سیوکالتو و رنگ‌سنجی به کمک آلومینیوم کلراید صورت پذیرفت. ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری به دو روش DPPH و ABTS محاسبه شد. میزان اثر سمیت سلولی اسانس رزماری بر رده‌های سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات گروه‌های عاملی زیست فعال موجود در اسانس با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه بررسی شد. نتایج حاصل از تجزیه ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری شامل ۲۹ ترکیب بودند که در مجموع ۹۴/۲۲٪ از کل اسانس را شامل شدند. عمده‌ترین ترکیب شناسایی شده در اسانس رزماری ترکیب اوکالیپتول با میزان ۴۰/۱۳٪ بود. محتوای تام فنلی اسانس رزماری ۷۲/۵۵ میلی گرم گالیک اسید در گرم اسانس و میزان فلاونوئید آن برابر با ۳۶ میلی‌گرم کوئرستین اکی‌والان در گرم اسانس بود. میزان سنجش مهار رادیکال آزاد در دو روش DPPH و ABTS به‌ترتیب برابر با ۷۸/۷۴٪ و ۸۱/۹۷٪ به‌دست آمد. نتایج مربوط به میزان سمیت سلولی اسانس رزماری نشان داد که اثر سیتوتوکسیک وابستگی زیادی به غلظت داشته و با افزایش غلظت اسانس میزان سمیت سلولی نیز افزایش یافت. تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه حضور ترکیبات آلدهیدها، کتون‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و آلکن‌ها را اثبات نمود. نتایج مربوط به تمامی آزمون‌های اسانس رزماری نشان داد که این اسانس می‌تواند به عنوان یک منبع بالقوه در صنایع داروسازی و غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، کروماتوگرافی گازی، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، رادیکال آزاد.

مقدمه

واکنش‌های اکسایشی برای ادامه حیات انسان مورد نیاز می‌باشد، اما این واکنش‌ها در بعضی مواقع ممکن است مخرب باشند. شواهدهای بسیار زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد بسیاری از بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، بیماری‌های عروقی، اختلالات (عصبی، کلیوی، کبدی) و فساد مواد غذایی ناشی از واکنش‌های اکسایشی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Rahman, 2007, Lü et al., 2010). یکی از بزرگترین عامل مرگ و میر در میان جوامع بشری سرطان می‌باشد، اما درمان‌هایی که در حال حاضر صورت می‌پذیرد اغلب مؤثر نبوده و اثرات نامطلوب زیادی را در پی داشته است (Newman et al., 2003). بعضی از گونه های اکسیژن فعال مانند آب اکسیژنه و رادیکال‌های آزاد همانند هیدروکسیل و سوپراکسید می‌توانند با بعضی از چربی‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های بدن وارد واکنش شوند و باعث از بین رفتن آن‌ها گردند. به‌طور کلی هر ماده‌ای که فرآیند اکسیداسیون را به تأخیر بیندازد و یا مانع ایجاد آن گردد، آنتی‌اکسیدان نام دارد (Halliwell, 2007, Halliwell, 2011). با توجه به وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در پلاسمای خون از جمله سوپر اکساید دیسموتاز و کاتالاز، اما سیستم ایمنی بدن به تنهایی قادر به حذف رادیکال‌های تولید شده در بدن

۱، ۲، ۳ و۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد، استادیار و دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68369.1013

نمی‌باشد، از این رو باید آنتی‌اکسیدان‌ها از منابع خارجی تأمین گردند که این نیاز نیز تنها از طریق مواد غذایی تأمین می‌شود (Young and Woodside, 2001, Collins, 2005). آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور مستقیم از تولید ذرات فعال جلوگیری می‌کنند و یا به‌صورت غیرمستقیم اثر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در بدن را تقویت می‌کنند (Khlebnikov et al., 2007). امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی به دلیل تأثیرات زیان بار، اثرات جهش‌زا و سرطان‌زایی که دارند محدود شده است. با توجه به اثبات اثرات منفی و زیان بار این افزودنی‌های شیمیایی بر سلامت جامعه، از این رو علاقه پژوهشگران به یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و بدون اثرات جانبی زیان‌آور افزایش یافته است (Shahidi et al., 2006). در کنار سایر متابولیت‌های ثانویه گیاهی، پلی‌فنول‌ها ترکیبات فعالی هستند که به مقدار زیادی در اندام های مختلف گیاهان از جمله اندام‌های هوایی آن‌ها همانند برگ، دانه و میوه آن‌ها یافت می‌شود. این متابولیت‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار زیادی در زمینه ممانعت از فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و نیتروژن از خود نشان داده‌اند. از میان مهم‌ترین ترکیبات پلی‌فنول‌ها می‌توان به ترکیباتی همانند فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی اشاره کرد (Petti et al., 2009, Di Domenico et al., 2012). با توجه به اینکه فلاونوئیدها در ساختار حلقوی خود دارای گروه‌های هیدروکسیل فنولیک می‌باشند، بنابراین این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند. این ترکیبات به‌عنوان ممانعت‌کننده رادیکال‌های آزاد سوپر اکساید و اهداء کننده هیدروژن عمل می‌کند. همچنین این ترکیبات، آنزیم‌های آنتی اکسیدان‌ها را نیز فعال نموده و از تولید رادیکال‌های آزاد و آلفاتوکوفرول جلوگیری می‌نماید. محققان با توجه به پژوهش‌های که در چند دهه اخیر انجام داده‌اند، خاصیت ضدسرطانی این ترکیبات را نیز به اثبات رسانیده‌اند (Collins, 2005, Prochazkova et al., 2011, Wang et al., 2011, Di Domenico et al., 2012). ترکیبات مفید و با ارزش زیادی درگیاهان دارویی وجود دارند، از این رو گیاهان دارویی باعث افزایش کیفیت و ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی می‌گردند. در میان سایر گونه‌های گیاهان دارویی گیاه رزماری با نام علمی (*Rosmarinus officinalis* L.) از خانواده نعناعیان[1] می‌باشد. این گیاه در بسیاری از نقاط جهان از جمله ایران کشت می‌شود اما موطن اصلی این گیاه را سواحل دریای مدیترانه نسبت داده‌اند (Gaya et al., 2013, Petiwala and Johnson 2015). این گیاه در بسیاری از مواد غذایی به‌عنوان افزودنی استفاده می‌گردد. در پژوهش‌های مختلفی که تاکنون انجام شده است، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت کنندگی گیاه رزماری گزارش شده است (Gaya et al., 2013). بیشترین خواص آنتی اکسیدانی موجود در این گیاه مربوط به ترکیبات دی‌ترپن‌های فنلی می‌باشد. بیشترین دی‌ترپن‌ها موجود درگیاه رزماری که تاکنون گزارش شده است شامل اسیدکارنوزول، رزمانول، کارنوسیک، اپی‌رزمانول، ایزورزمانول می‌باشد (Gaya et al., 2013, Amaral et al., 2013, Soltani et al., 2014). هدف از این پژوهش شناسایی ترکیبات شیمیایی و گروه‌های عاملی زیست فعال، قدرت آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام فنلی، فلاونوئید کل و اثر سمیت سلولی اسانس رزماری بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل: متانول (مرک، آلمان)، کربنات سدیم[2] (سامچون، کره)، معرف فولین سیوکالتو[3] (مرک، آلمان)، آلومینیوم تری کلراید (یونی، چم)، نیتریت سدیم[4] (سام چونگ، کره)، سود (مرک، آلمان)، الکل ۹۶٪ (ایران)، رادیکال DPPH[5] (سیگما آلدریچ، آمریکا)، گالیک اسید[6] (یونی، چم)، کوئرستین[7] (سیگما آلدریچ، آمریکا)، رادیکال کاتیون ABTS[8] (سیگما آلدریچ، آمریکا)، محیط کشت DMEM[9] (سیگما آلدریچ، آمریکا) بود.

تهیه اسانس

اسانس رزماری مورد استفاده در این پژوهش از شرکت جوهره طعم مشهد (مشهد، خراسان رضوی) خریداری گردید و در ظروف تیره رنگ دربدار و بدون تماس با نور به آزمایشگاه شیمی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل شد.

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری با استفاده از GC-MS

در این پژوهش برای تجزیه ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری، از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (Agilent Technologies 7890 A، آمریکا) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی (5975 C Agilent Technologies، آمریکا)

1 Lamiaceae
2 Na_2CO_3
3 Folin–Ciocalteu
4 Sodium nitrite
5 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
6 Gallic acid
7 Quercetin
8 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
9 Dulbecco's Modified Eagle Medium

استفاده گردید. در این روش میزان ۰/۲ میکرولیتر از اسانس رزماری به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد تا نوع و طیف ترکیبات تشکیل دهنده آن مشخص گردد. گاز حامل در این پژوهش گاز هلیم با خلوص (۹۹/۹۹٪) با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه بود. ستون دستگاه (Agilent Technologies Inc., HP-5 MS، آمریکا) از نوع مویینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۲۵ میکرومتر بود. در نهایت، ترکیبات متشکله اسانس رزماری در مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه الکترونی Wiley موجود در نرم‌افزار و مقایسه با اعداد استاندارد موجود درکتب و مقالات مرجع شناسایی گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2017, Alizadeh Behbahani and Fooladi., 2018).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری

بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد به روش DPPH

به‌طور کلی DPPH یک رادیکال آزاد پایدار می‌باشد که این رادیکال روی یکی از اتم‌های پل نیتروژنی خود دارای یک الکترون جفت نشده می‌باشد. در طی این روش رادیکال‌های پایدار DPPH دارای رنگ بنفش می‌باشند، که این رادیکال‌ها با عوامل کاهنده مناسب (H-A) شروع به واکنش می‌کنند و در طی این واکنش الکترون‌ها به یکدیگر متصل می‌شوند و محصول نهایی حاصل از این واکنش یک مولکول دیا مغناطیس زرد رنگ پایدار است که DPPH نامیده می‌شود. تعداد الکترون‌های از دست داده شده در طی این واکنش باعث کاهش رنگ محلول می‌شود. روش سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH در واقع بستگی به میزان توانایی آن به‌عنوان یک رادیکال آزاد پایدار در جهت رنگبری در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها است. برای انجام این آزمون ۱میلی‌لیتر از اسانس با ۳ میلی‌لیتر از محلول DPPH متانولی (۰/۱ میلی مولار)، با یکدیگر مخلوط شدند، سپس نمونه‌ها مورد نظر در یک مکان و محفظه تاریک به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. در نهایت جذب نمونه-ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل نمونه شاهد (متانول) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد (Brand- Williams et al., 1995). فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بر حسب درصد مهارکنندگی طبق رابطه ۱ محاسبه شد.

$$\text{فعالیت مهار رادیکال آزاد} = \frac{\text{نمونه جذب کنترل} - \text{نمونه جذب اسانس}}{\text{نمونه جذب کنترل}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

بررسی توانایی مهار کنندگی به روش ABTS

به‌منظور ارزیابی میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد به روش ۲ و ۲– آزینو– بیس– اتیل بنزو تیازولین– سولفونیک اسید (ABTS) از روش Shan و همکاران (۲۰۰۵) استفاده گردید. در این روش در ابتدا یک محلول آبی از ABTS به غلظت ۷ میلی‌مولار تهیه گردید، سپس محلول تهیه شده به پتاسیم پرسولفات اضافه شد تا غلظت نهایی آن ۲/۴۵ میلی‌مولار در محلول شود. محلول حاصل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) و در مکان تاریک به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شد. قبل از استفاده از کاتیون رادیکال ABTS محلول مورد نظر توسط متانول به حدی رقیق‌سازی گردید تا جذب محلول در طول موج ۷۳۴ نانومتر در محدوده جذبی ۰/۰۲± ۰/۷ قرار گرفت. در نهایت ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس رزماری به ۳/۹ میلی‌لیتر محلول رادیکال ABTS افزوده شد. پس از سپری شدن ۶ دقیقه محلول مورد نظر به دستگاه اسپکتروفتومتری منتقل گردید و در طول موج ۷۳۴ جذب آن قرائت و یاداشت گردید (Shan et al., 2005). درصد جذب رادیکال آزاد با استفاده از معادله ۲، محاسبه گردید.

$$\text{فعالیت مهار رادیکال آزاد} = \frac{\text{نمونه جذب کنترل} - \text{نمونه جذب اسانس}}{\text{نمونه جذب کنترل}} \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

تعیین فنل کل

میزان کل محتوای تام فنلی اسانس رزماری به کمک روش فولین–سیوکالتو مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور کلی این روش ظرفیت آنتی اکسیدانی را به‌صورت مستقیم مورد سنجش قرار نمی‌دهد، بلکه به‌طور کلی تکمیل کننده روش‌های ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. برای این منظور در ابتدا غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس رزماری با کمک الکل ۹۶٪ تهیه شد. در ادامه ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از غلظت‌های ذکر شده با ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فولین ۱۰٪ در یک لوله آزمایش با یکدیگر مخلوط شدند. سپس بعد از گذشت مدت زمان ۶ دقیقه میزان ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷٪ به ترکیب قبلی اضافه گردید. در نهایت نمونه‌های تهیه شده پس از سپری کردن مدت زمان یک ساعت به دستگاه اسپکتروفتومتری انتقال داده شد و در طول موج ۷۲۵ نانومتر جذب آن‌ها اندازگیری و اعداد آن‌ها قرائت گردید. در انتها میزان کل ترکیبات فنلی موجود در اسانس رزماری بر حسب گالیک اسید و با توجه به معادله به‌دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج آن بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم اسانس گزارش گردید (Dehghan et al., 2018).

ترکیبات فلاونوئیدی

برای سنجش محتوای فلاونوئید اسانس رزماری از روش رنگ سنجی به کمک آلومینیوم کلراید استفاده گردید. در ابتدا به ۱ میلی‌لیتر از اسانس خالص رزماری به ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵٪ اضافه شد. سپس محلول به‌دست آمده به‌مدت زمان ۶ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد، بعد از سپری شدن مدت زمان مذکور میزان ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیم کلراید ۱۰٪ به آن اضافه گردید و سپس محلول مورد نظر به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. پس از سپری

شدن این زمان ۱ میلی‌لیتر سود یک مولار به محلول تهیه شده اضافه گردید و در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی ماوراء بنفش خوانده شد. در این روش از کوئرستین به‌عنوان استاندارد استفاده شد. در نهایت محتوای فلاونوئید به‌صورت میلی‌گرم کوئرستین برحسب اکی‌والان گزارش شد (Haghjoo et al., 2020).

سمیت سلولی اسانس رزماری

اثر سمیت سلولی اسانس رزماری در برابر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) با استفاده از روش MTT[1] اندازه‌گیری شد. روش MTT یکی از روش‌های مرسوم و سریع برای سنجش میزان سمیت داروها می‌باشد، که اساس آن تشکیل رنگ فورمازان به دلیل احیای ترکیب MTT (دی متیل تیازول ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برمید) و یا دیگر نمک‌های تترازولیوم است. جهت فراهم کردن محیط کشت کامل، محیط کشت DMEM، محیط حاوی گلوکز بالا، ۱۰٪ (حجمی-حجمی) سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین و استرپتومایسین با یکدیگر مخلوط شدند، سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت رطوبت ثابت ۹۵٪ و ۵٪ دی‌اکسید کربن در انکوباتور قرار داده شدند. برای انجام این آزمون از میکروپلیت استفاده گردید که در هر کدام از خانه‌ها حدود ۱۰۰ هزار سلول کشت داده شد. سپس این محیط با یک محیط کشت حاوی DMEM و سرم جنین گاوی به میزان (۲۰۰ میکرولیتر) و رقت‌های متوالی اسانس رزماری (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) جایگزین گردید. در این مطالعه چاهک حاوی سوسپانسیون سلولی فاقد اسانس به‌عنوان چاهک کنترل انتخاب گردید. پس از گرمخانه‌گذاری میکروپلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت میزان ۳۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر کدام از چاهک‌ها افزوده گردید و مجدد میکروپلیت‌ها به‌مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. محیط رویی را به آرامی با ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید جایگزین نموده و در نهایت شدت رنگ کریستال‌های فورمازان تولید شده مورد نظر توسط دستگاه الایزا پلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. در نهایت منحنی‌های زنده ماندن سلولی با توجه به سلول‌های کنترل ترسیم شد (Alizadeh Behbahani et al., 2019).

طیف‌سنجی مادون قرمز اسانس رزماری

به‌طور کلی طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز برای شناسایی گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی و تشخیص کیفی نوع پیوندهای مواد مختلف از جمله اسانس‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش دستگاه مورد استفاده برای این آنالیز ساخت شرکت (Perkin Elmer Co., MA, USA) در محدوده طول موج ۴۰۰۰-۴۵۰ cm^{-1} رسم گردید (Sampaio et al., 2012, Rodrigues et al., 2015).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های این پژوهش به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی ترکیبت شیمیایی اسانس رزماری

یافته‌های حاصل از شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی در جدول ۱، آورده شده است. در شکل ۱، اعداد درج شده در ستون افقی کروماتوگرام، نشانگر مدت زمان جداسازی و شناسایی هریک از ترکیبات موجود در اسانس رزماری و اعداد درج شده در ستون عمودی میزان فراوانی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس رزماری را نشان می‌دهد. در این پژوهش، ۲۹ ترکیب موجود در اسانس رزماری شناسایی شدند که در مجموع، ۹۴/۲۲٪ از ترکیبات موجود در اسانس را تشکیل می‌دادند. عمده‌ترین ترکیب موجود در اسانس رزماری مورد استفاده در این پژوهش اوکالیپتول یا (۱و ۸- سینئول) به میزان ۴۰/۱۳٪ بود. سایر ترکیبات غالب موجود در اسانس رزماری شامل: گاماترپینن (۱۳/۶۷٪)، آلفا ترپینن (۱۱/۴۲٪) و ایزوپروپیل میریستات (۷/۴۷٪) بود. Melka Abdo و همکاران (۲۰۱۸)، خصوصیات شیمیایی و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی ارقام مختلف اسانس رزماری را در کشور اتیوپی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که که عمده‌ترین ترکیبات موجود در ارقام مختلف اسانس رزماری به شرح ذیل می‌باشد: در اسانس رزماری شماره ۰۱ بیشترین ترکیبات مربوط به اوکالیپتول (۲۲/۲۵٪)، آلفا- پینن (۲۰/۳۹٪) و کامفور (۸/۰۴٪)، در اسانس رزماری شماره ۰۲ بیشترین ترکیبات مربوط به اوکالیپتول (۲۱/۴۶٪)، آلفا- پینن (۱۷/۲۷٪) و وربنون (۱۳/۶۵٪) و در اسانس رزماری شماره ۰۳ بیشترین ترکیبات مربوط به اوکالیپتول(۲۱/۴۶٪)، آلفا- پینن (۱۷/۲۷٪) و اندو-بورنئول (۹/۰۹٪) بود. همچنین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ارقام بر اساس IC_{50} در حدود ۴۵۷/۰۱ تا ۵۸۹/۶۸ بوده است (Melka Abdo

---

1 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

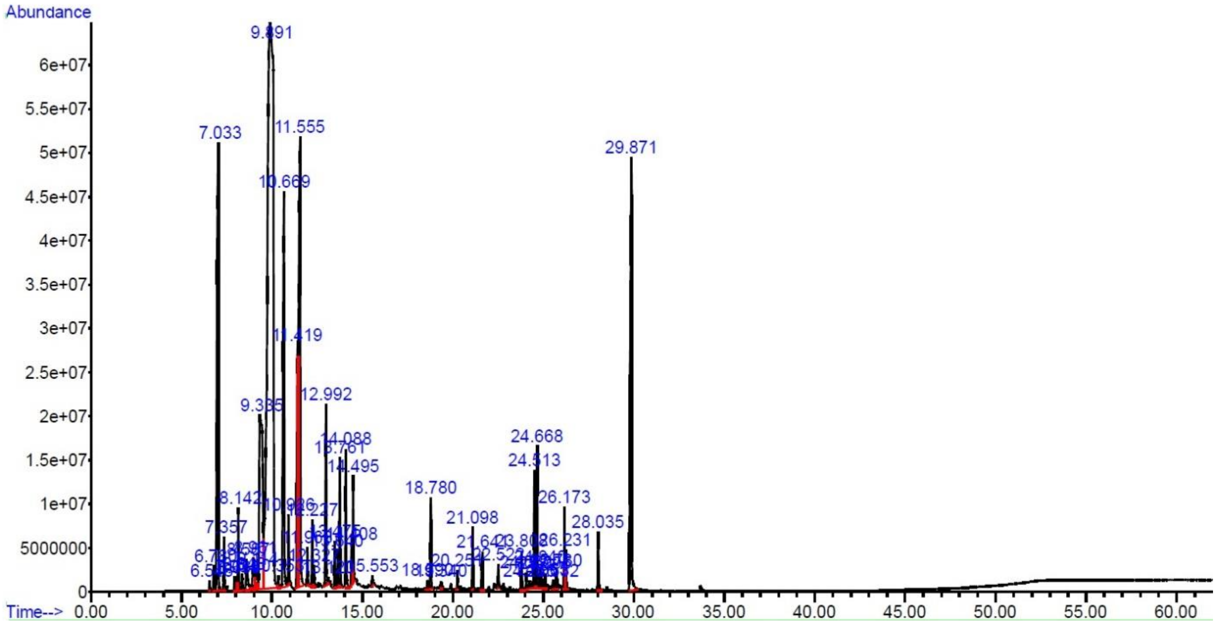
et al., 2018). Jafarzadeh Khaledi و همکاران (۲۰۱۰)، اثر اسانس رزماری روی روند رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در سوپ آماده تجارتی را مورد بررسی قرار دادند. بیشترین ترکیبات شناسایی شده موجود در پژوهش آن‌ها مربوط به ترکیب وربنون به میزان ۱۱/۴۲٪ بود (Jafarzadeh Khaledi et al., 2010). Jalali-Heravi و همکاران (۲۰۱۱)، اسانس رزماری ایرانی را با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به‌طیف‌سنجی جرمی همراه با کمومتریکس را مورد تجزیه و تحلیل اسانس قرار دادند (Jalali-Heravi et al., 2011). بیشترین ترکیبات موجود در اسانس رزماری ایرانی مربوط به ترکیبات ۱و ۸- سینئول (۲۳/۴۷٪)، آلفا پینن (۲۱/۷۴٪)، بربونون (۷/۵۷٪) و کامفور (۷/۲۱) می‌باشد. Roomiani و همکاران (۲۰۱۶)، در طی پژوهشی بیان نمودند که بیشترین ترکیبات موجود در اسانس رزماری مربوط به ترکیبات آلفا پینن (۱۹٪)، ۱ و ۸- سینئول (۹/۰۵٪)، کامفور (۸/۵۰٪) و کامفن (۶/۴۳٪) بودند (Roomiani et al., 2016).

جدول ۱- شناسایی ترکیبات اسانس رزماری با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی
Table 1. Composition of Rosmarinus officinalis essential oil determined by GC–MS.

ردیف Row	ترکیبات شناسایی شده Detected compounds	%	زمان بازداری (دقیقه) Retention Time (min)
1	β.-Pinene	0.8	6.54
2	Sabinene	0.12	8.06
3	β.-Myrcene	0.61	8.58
4	α.-Phellandrene	0.72	8.96
5	Eucalyptol	40.13	9.99
6	ɣ.-Terpinene	13.67	10.67
7	α.-Terpinolene	0.15	11.42
8	α.-Terpinene	11.42	11.42
9	Butanoic acid	0.32	11.97
10	Bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol	0.74	12.22
11	Carene	7.5	12.32
12	Isoborneol	0.38	13.47
13	Pinocarvone	0.35	13.64
14	endo-Borneol	1.23	13.76
15	trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	0.43	14.40
16	1 L-.alpha.-Terpineol	1	14.49
17	Camphene	1.19	18.78
18	Longifolene	0.15	20.25
19	Aromandendrene	0.52	21.09
20	1Alloaromadendrene	0.52	21.64
21	Bicyclogermacrene	0.24	22.52
22	Cyclohexanemethanol,	0.37	23.80
23	Epiglobulol	0.16	24.06
24	Globulol	1.33	24.06
25	Spathulenol	1.11	24.51
26	Ledol	0.23	24.84
27	ɣ.-Eudesmol	0.25	25.73
28	Naphthalenemethanol,	1.21	26.23
29	Isopropyl myristate	7.47	29.87
کل Total		94.22	

Alipour و همکاران (۲۰۱۹)، با مطالعه‌ای روی اسانس رزماری بیان نمودند که بیشترین ترکیبات موجود در اسانس مورد پژوهش آن‌ها به‌ترتیب مربوط به آلفا پینن و ۱ و ۸- سینئول با درصدهای ۲۶/۱۲ و ۹/۵۵ بودند (Alipour et al., 2019). Jianga و همکاران (۲۰۱۱)، ترکیب شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس رزماری را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشترین ترکیبات اسانس رزماری مورد استفاده در پژوهش آن‌ها ۱ و۸- سینئول (۲۶/۵۴٪) بود (Jianga et al., 2011). Malakootian و همکاران (۲۰۱۳)، در طی مطالعه‌ای ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری را مورد بررسی قرار دادند. در آنالیز اسانس رزماری ۲۰ ترکیب شناسایی گردید که ۸۲/۰۹٪

از این ترکیبات شامل ۱و ۸- سینئول، آلفاپینن، وربنون، کامفور، بربونون و لیمونن بود (Malakootian et al., 2013). Kivanc و همکاران (۱۹۹۸)، گزارش دادند که فعال‌ترین اجزای اسانس‌ها فنل‌ها و متعاقب آن آلدهید و کتون بودند. همچنین آن‌ها بیان نمودند یکی از ترکیبات اصلی اسانس رزماری ۱و ۸- سینئول است (Kivanc et al., 1998).



شکل ۱- کروماتوگرام اسانس رزماری.

Fig. 1. Chromatogram of Rosmarinus officinalis essential oil.

فنل کل اسانس رزماری

میزان محتوای تام فنلی اسانس رزماری با روش فولین- سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت. در این روش مقدار جذب اسانس رزماری با مقدار جذب اسید گالیک مقایسه گردید. میزان محتوای تام فنلی اسانس رزماری مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲، بیان شده است. Selmi و همکاران (۲۰۱۷)، در پژوهشی خود میزان محتوای تام فنلی اسانس رزماری را به‌ترتیب ۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (Selmi et al., 2017). Alvarez و همکاران (۲۰۱۹)، در پژوهش خود میزان فنل کل اسانس رزماری ۰/۷ ±۸/۹ میلی گرم بر میلی‌لیتر بیان نمودند (Alvarez et al., 2019). Jamshidi و همکاران (۲۰۰۹)، در طی مطالعه‌ای ترکیبات فنلی چند گونه گیاهی بومی مازندران را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی آن‌ها نشان داد که میزان گیاه رزماری به‌ترتیب برابر با ۵۹/۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (Jamshidi et al., 2009). Bubonja-Sonje و همکاران (۲۰۱۱)، در پژوهشی میزان محتوای تام فنلی عصاره رزماری را به ۴۵۰ میلی‌گرم برگرم گزارش کردند (Bubonja-Sonje et al., 2011). Hendel و همکاران (۲۰۱۶)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری و اثر مهاری آن بر *پنیسیلیوم دیگیتاتوم* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها نشان داد میزان فنل موجود در عصاره رزماری مورد پژوهش برابر با ۱۲۹ میلی‌گرم بر گرم گالیک اسید بود (Hendel et al., 2016). Santos و همکاران (۲۰۱۲) اعلام نمود ماهیت فیزیکوشیمیایی فنل‌های فرد موجود در عصاره‌ها و اسانس‌ها ممکن است در کمک به فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به کل فنلی کل اهمیت بیشتری داشته باشد (Santos et al., 2012). Moreno و همکاران (۲۰۰۶) و Wojdyło و همکاران (۲۰۰۷)، در پژوهش‌های جداگانه میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره رزماری را پایین گزارش نمودند (Moreno et al., 2007; Wojdyło et al., 2007). از آنجایی که گیاهان با ارزشمندترین منابع ترکیبات فنلی مانند اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها و تانن‌ها می‌باشند، بنابراین از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نیز به شمار می‌روند. با توجه به اینکه آنتی‌اکسیدان‌های موجود در مواد غذایی بدن انسان را در مقابل استرس اکسیداتیو حفظ می‌نماید از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند. مطالعات بسیاری در زمینه خواص آنتی‌اکسیدانی انجام پذیرفته است (Jamshidi et al., 2010, Pourmorad et al., 2006). همانطور که در جدول ۲، نشان داده شده است با توجه به میزان بالای فنل کل و میزان بالای فعالیت آنتی اکسیدانی موجود در اسانس رزماری مورد استفاده پیش‌بینی می‌شود این دو ترکیب با یکدیگر ارتباط مستقیمی دارند. نتایج حاصل از سایر پژوهش‌های محققین نیز نشان داده است، گیاهانی که دارای ترکیبات

فنلی بالاتری می‌باشند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز دارند (Jamshidi et al., 2010, Pourmorad et al., 2006). از سوی دیگر با توجه به اینکه ترکیبات فنلی به صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شود و دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز می‌باشند، بنابراین به‌طور مؤثری به‌عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده، لذا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و مؤثر عمل می‌کنند.

میزان فلاونوئید کل اسانس رزماری

میزان ترکیبات فلاونوئید کل موجود در اسانس رزماری با استفاده از معرف آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان فلاونوئید موجود در اسانس رزماری برابر با ۳۶ میلی‌گرم کوئرستین اکی‌والان در گرم اسانس بود که در جدول ۲، نشان داده شده است. Selmi و همکاران (۲۰۱۷)، میزان فلاونوئیدی اسانس رزماری را برابر با ۲/۹۷ ±۱۴/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (Selmi et al., 2017). Jamshidi و همکاران (۲۰۰۹)، در بررسی‌های خود، روی گیاه رزماری میزان فعالیت فلاونوئیدی آن را ۱۳۰/۷۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان نمودند (Jamshidi et al., 2009). Yesil-Celiktas و همکاران (۲۰۰۷ b)، میزان فلاونوئید موجود در عصاره رزماری را بین ۳۴/۱ تا ۱۴۷/۳ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره را صرف نظر از زمان جمع‌آوری را گزارش دادند (Yesil-Celiktas et al., 2007). Yesil-Celiktas و همکاران (۲۰۰۷)، در پژوهش دیگری بیان نمودند که ترکیبات موجود در عصاره رزماری با توجه به نوع عصاره، محل و زمان برداشت تغییر می‌یابد، بنابراین میزان ترکیبات موجود در عصاره‌ها جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی و در زمان‌های مختلف به میزان قابل توجهی با یکدیگر تفاوت دارند (Yesil-Celiktas et al., 2007). Hendel و همکاران (۲۰۱۶)، در پژوهش خود میزان فلاونوئید موجود در عصاره رزماری را ۳۸ میلی‌گرم معادل کوئرستین/ گرم عصاره خشک ذکر نمودند (Hendel et al., 2016).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری

در طی فرآیند DPPH آنتی‌اکسیدان‌ها با رادیکال‌های آزاد DPPH واکنش می‌دهند که در نتیجه آن را کم رنگ یا بی‌رنگ می‌نمایند. هر چقدر میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه بیشتر باشد میزان کاهش رنگ آن نیز بیشتر است، بنابراین میزان کاهش رنگ با قدرت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم دارد (Kamkar et al., 2010). نتایج مربوط به مهار رادیکال آزاد به روش DPPH در جدول ۲، ذکر شده است. در این روش میزان مهار رادیکال آزاد ۷۸/۷۴٪ به دست آمد. Erkan و همکاران (۲۰۰۸)، همچنین آن‌ها در طی پژوهشی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری، اسانس سیاه دانه، کارنوسیک اسید، رزمارینیک اسید و سسامول را مورد بررسی قرار دادند. همچنین آن‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی رزماری را به ترکیبات فنولیک که شامل کارنوزول، کارنوزیک اسید، رزمارینیک اسید و رزمانول می‌باشد نسبت دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری به روش مهار رادیکال آزاد DPPH، ۱/۴ ±۵۴ درصد بوده است (Erkan et al., 2008). Mohammadi (۲۰۱۵)، بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی و اتانولی گیاه رزماری، مریم گلی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان های سنتزی BHT و TBHQ در روغن ماهی را مورد مطالعه قرار داد. نتایج حاصل از پژوهش آن نشان داد که درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، عصاره متانولی و اتانولی گیاه رزماری به‌ترتیب ۱۸/۱۲ و ۲۸/۸۴ میکروگرم بر میلی‌گرم برحسب IC_{50} بود (Mohammadi et al., 2015). Alizadeh و همکاران (۲۰۱۴) بررسی اثرات آنتی-اکسیدانی عصاره رزماری و چویر در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ بر روند اکسیداسیون روغن حین فرآیند سرخ کردن عمیق را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که عصاره رزماری دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره چویر می‌باشد (Alizadeh et al., 2014). Selmi و همکاران (۲۰۱۷)، در طی پژوهشی بیان نمودند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری ۴/۲۷ ±۲۲۱/۴۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} گزارش کردند (Selmi et al., 2017). Alvarez و همکاران (۲۰۱۹)، اثرات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و حسی اسانس‌های پونه کوهی و رزماری را روی گل کلم بروکلی مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری را ۳۹/۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر بیان نمودند (Alvarez et al., 2019). Fernandez و همکاران (۲۰۰۵)، در طی پژوهشی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی-باکتریایی عصاره‌های رزماری، پرتقال و لیمو را در گوشت پخته مورد مطالعه و مقایسه قرار دادند. مطالعه حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که در میان عصاره‌ها مورد پژوهش، عصاره رزماری فعالیت آنتی-اکسیدانی بیشتری نسبت به باقی عصاره‌ها دارد (Fernandez et al., 2005). Jamshidi و همکاران (۲۰۰۹)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی چند گونه گیاهی بومی مازندران را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی آن‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری برابر با ۴۲/۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (Jamshidi et al., 2009).

در آزمون تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس به روش ABTS رادیکال کاتیون‌های ABTS با آنتی‌اکسیدان‌ها یا دیگر گونه‌های رادیکالی موجود در اسانس که دهنده هیدروژن می‌باشند، واکنش می دهند که به شکل کاهش یافته در می‌آیند در نهایت برای تعیین میزان این کاهش، با جذب آن‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر، می‌توان به درصد بازدارندگی آنتی‌اکسیدانی پی‌برد (Esmaeli et al., 2017). نتایج

مربوط به تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری به روش ABTS در جدول ۲، نشان داده شده است. Erkan و همکاران (۲۰۰۸)، فعالیت های آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری، اسانس سیاه دانه[1]، کارنوسیک اسید، رزمارینیک اسید و سسامول را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ABTS در سه بازه زمانی مختلف (۱، ۴ و ۶ دقیقه)، به‌ترتیب برابربا ۱/۱± ۱۵/۵، ۱/۱± ۱۵/۶ و ۱/۰± ۱۵/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} بوده است (Erkan et al., 2008). Kanth و همکاران (۲۰۱۸)، در طی مطالعه‌ای فعالیت ضدمیکروبی، آنتی‌بیوفیلم و پتانسیل آنتی-اکسیدانی اسانس رزماری را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری اندازه‌گیری شده توسط این روش را ۴۴/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} بیان نمودند (Kanth et al., 2018). Rababah و همکاران (۲۰۰۴)، اشاره نمودند فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری می‌تواند ناشی از ترکیبات فنلی کارنوزول، اسید کارنوزی، رزمارنیک اسید، روزمانول موجود در عصاره باشد (Rababah et al., 2004).

جدول۲- نتایج آزمون¬های شیمیایی اسانس رزماری.

Table 2- Result of chemical analysis of Rosmarinus officinalis essential oil

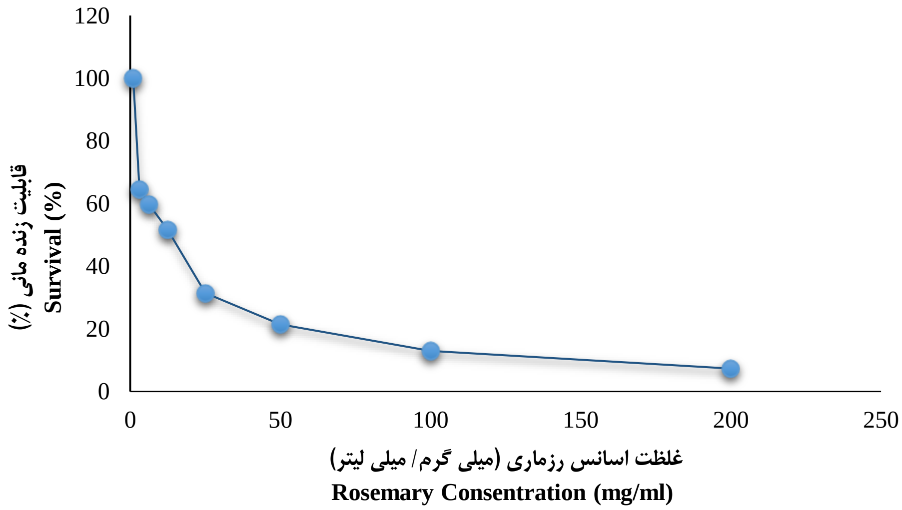
آزمون شیمیایی Chemical analysis	نتایج Result
DPPH (٪)	78.74±1.06
ABTS (٪)	81.97±0.58
فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید اکی‌والان/ گرم اسانس) Total phenol (mg of galic acid equivalent /g essential oil)	72.55±0.45
فلاوونوئید (میلی‌گرم کوئروستین اکی‌والان) Flavonoid (mg quercetin equivalent)	36.00±0.50

ارزیابی نتایج سمیت سلولی اسانس رزماری

از روش MTT به‌منظور بررسی اثرات سمیت سلولی اسانس با توجه به سادگی آن استفاده می‌گردد. در این پژوهش میزان سمیت سلولی اسانس رزماری توسط روش MTT در غلظت‌های (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی لیتر) بر رده‌های سلولی HT29 صورت پذیرفت. شکل ۲ میزان اثر سمیت سلولی اسانس رزماری بر رده‌های سلولی HT29 پس از ۲۴ ساعت واکنش نشان می‌دهد. میزان سمیت سلولی وابسته به غلظت اسانس رزماری بود. هرچه میزان غلظت اسانس بالاتر بود میزان سمیت سلولی نیز افزایش می‌یافت. در شکل ۲، نشان داده شده است که بیشترین درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های پایین‌تر به‌ویژه در غلظت ۳/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و هر چقدر میزان غلظت اسانس افزایش می‌یافت (به‌ویژه در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، زنده ماندن سلول‌ها نیز نسبتاً کاهش پیدا کرده است. به‌طور کلی می‌توان با داده‌ای MTT تأیید کرد که غلظت کم اسانس رزماری می‌تواند تکثیر سلولی را به میزان قابل توجهی تحریک کند ($P < 0.05$). Asanova و همکاران (۲۰۰۳)، نشان داد که این جزء از اسانس رزماری از نظر سمیت بسیار قوی و عملکرد ضدسرطانی دارد. این امکان وجود دارد که این مؤلفه نقش مهمی در سمیت سلولی این اسانس داشته باشد (Asanova et al., 2003). ۱ و ۸ – سینئول اثر سمی قوی بر سلول های یوکاریوت‌ها دارد (Obeng-Ofori et al., 1997, Santos et al, 2004). با توجه به اینکه اسانس رزماری علاوه بر سمیت سلولی بالا ممکن است دارای پتانسیل ضدتومور و سموم دفع آفات را نیز داشته باشد. فرض بر این است که مونوترپن‌های اکسیژن‌دار اسانس دارای درجه متفاوتی از سمیت سلولی هستند. این ماده به‌عنوان یک ماده لیپوفیلی معمولی، از دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسم عبور کرده و ساختار سلول‌ها را مختل می‌کند (Faixovà and Faix., 2008). فعالیت ضد تکثیر یا سمیت سلولی ترکیبات و عصاره‌های مختلف رزماری بر رده‌های سلولی مختلف سرطان از جمله سرطان خون، پروستات، پستان، پوست و روده بزرگ قبلاً گزارش شده است (Yesil-Celiktas et al., 2010, NGO et al., 2011, Johnson., 2011, Einbond et al., 2012, Kar et al., 2012). Mohammadi و Hoveizi (۲۰۱۷)، تأثیر عصاره هیدروالکلی رزماری را بر سلول‌های سرطانی سر و گردن رده HN5 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که اسانس رزماری باعث کاهش بقای سلول های سرطانی گردید (Mohammadi and Hoveizi, 2017). Melka Abdo و همکاران (۲۰۱۷)، اثر ضدسرطانی عصاره گیاه رزماری بر

1 *Nigella sativa* L.

سلول‌های سرطانی رده MCF-7، SKBR-3 و سلول‌های فیبروبلاست HUP02 را مورد بررسی قرار داد. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها که اسانس رزماری بر رده‌های سلول‌های سرطانی MCF-7، SKBR-3 اثر ضدسرطانی داشت اما بر سلول‌های فیبروبلاست HUP02 فاقد اثر ضدسرطانی بود. در پژوهش‌های زیادی نشان داده شده است که عصاره رزماری بقاء سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهد که به صورت افزایش آپوپتوز و مرگ سلولی گزارش شده است (Melka Abdo et al., 2018). تیمار سلول‌های سرطانی کولون، پانکراس، پستان و ریه با عصاره رزماری باعث افزایش کلیواژ پلی ADP ریبوز پلیمراز (PARP)می‌شود که نشان‌دهنده افزایش آپوپتوز است (Moore et al., 2006).

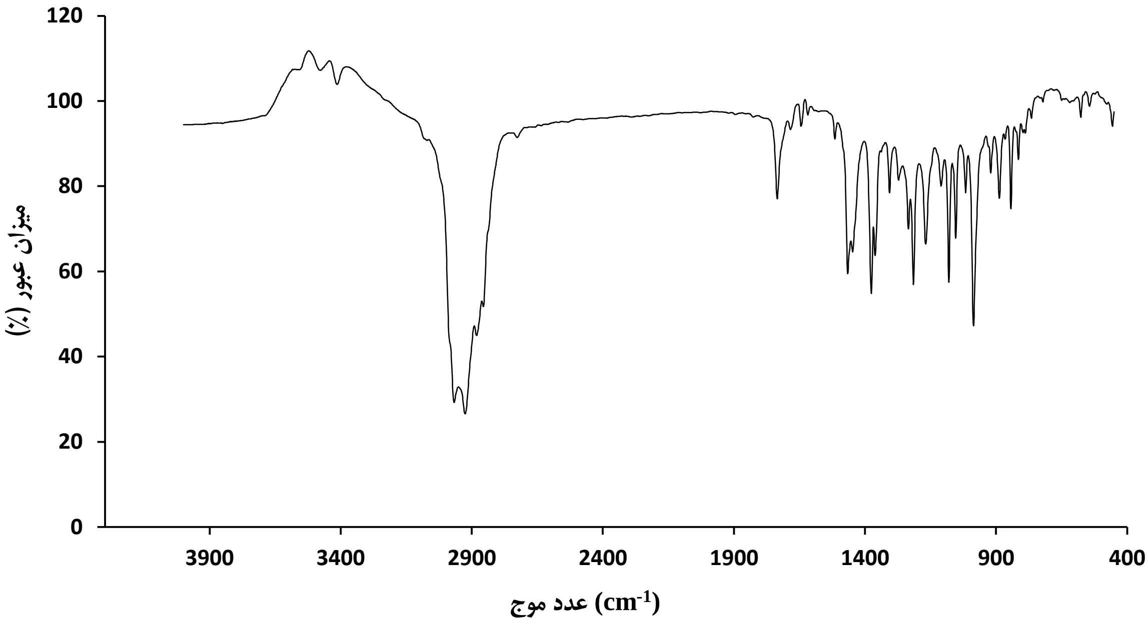


شکل ۲- اثر سمیت غلظت‌های مختلف اسانس رزماری بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) پس از ٢٤ ساعت.

Fig. 2. Cytotoxic effect of various concentrations of Rosmarinus officinalis essential oil on survival of HT29 cell line after 24 h.

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه اسانس رزماری

نتایج مربوط به طیف‌سنجی مادون قرمز اسانس رزماری در ناحیه $450cm^{-1}$ –۴۰۰۰ در دمای محیط (۲۰ درجه سانتی‌گراد) در شکل ۳، نشان داده شده است. پیک‌های موجود در ناحیه ۳۰۰۰– $3500\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسیل (O-H) که ممکن است مربوط به گروه‌های الکلی یا اسیدهای کربوکسیلیک باشد. محدوده بین ۲۸۰۰– $3000\ cm^{-1}$ به ویژه پیک‌های مربوط به ناحیه ۲۹۶۷ تا $2925/33\ cm^{-1}$ مربوط به حالت‌های کششی پیوندهای C-H گروه‌های متیل (CH_3) می‌باشد. که این پیک‌ها مربوط به ترکیبات الکلی موجود در اسانس می‌باشد (Cui et al., 2007, Kak et al., 2016). وجود پیک در طول موج $1734/71cm^{-1}$ نشان‌دهنده پیوندهای کتونی (C=O) می‌باشد که می‌تواند مربوط به ترکیباتی همچون آلدهیدها، کتون‌ها ، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و آلکن‌ها باشد. وجود پیک در طول موج $1465/78\ cm^{-1}$ –۱۳۷۵/۵۲نشان‌دهنده گروه‌های (CH_2) و (CH_3) می‌باشد. وجود پیک در ناحیه ۱۳۰۶– $1361\ cm^{-1}$ مربوط به پیوندهای (NO_2) و ترکیبات نیترو می‌باشد. پیک‌های موجود در ناحیه ۱۲۱۵– $1234\ cm^{-1}$ به‌ترتیب مربوط به پیوندهای C-OH و C-O-H می‌باشد. وجود پیک در طول موج ۱۱۵۰– $950\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاشات (C-O و C-O-C) می‌باشد (Kacurakova et al, 2000). ناحیه بین ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ ناحیه اثر انگشت نامیده می‌شود (Naji Tabasi and Razavi., 2016). نتایج حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز این پژوهش با نتایج Hameed و همکاران (۲۰۱۵) مشابهت زیادی داشت.



شکل۳- طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) اسانس رزماری.
Fig. 3. FT-IR spectra of *Rosmarinus officinalis* essential oil.

نتیجه‌گیری

نتایج مربوط به آزمون‌های شیمیایی (فنول کل، فلاونوئید و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی) اسانس رزماری نشان داد که این اسانس می-تواند به‌عنوان یک منبع بالقوه در صنعت داروسازی و تولیدات غذایی مورد استفاده قرار گیرد، آزمون شناسایی ترکیبات شیمیایی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی نشان داد بیشترین ترکیب موجود در اسانس رزماری مربوط به اوکالیپتول به میزان ۴۰/۱۳٪ بود. نتایج سمیت سلولی اسانس رزماری نشان داد که اثر سیتوتوکسیک اسانس رزماری وابستگی زیادی به غلظت آن دارد. تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز اسانس رزماری حضور ترکیبات آلدهیدها، کتون‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و آلکن‌ها را در این اسانس به اثبات رساند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Alipour, M., Jamal Saharkhiz, M., Niakousari, M. & Seidi Damyeh, M., (2019). Phytotoxicity of encapsulated essential oil of rosemary on germination and morphophysiological features of amaranth and radish seedlings. *Scientia Horticulturae*, 243, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.055
2. Alizadeh Behbahani, B. & Imani Fooladi, A. A., (2018). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 114, 299-303. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.055
3. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. & Falah, F., (2019). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of Syzygium aromaticum essential oil on foodborne pathogens. *Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 875-883.
4. Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Tabataba Yazdi, F., Mortazavi, S. A. & Mohebbi, M., (2017). Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 515-26. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.055

5. Alizadeh, L., Nayebzadeh, K., & Shahin, R., (2014). Antioxidant effect of rosemary and ferulago extracts and synthetic TBHQ on oil oxidation during deep-frying. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(4), 135-143. [In Persian].
6. Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A. & Ayala-Zavala, J. F., (2019). Antimicrobial, antioxidant, and sensorial impacts of oregano and rosemary essential oils over broccoli florets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13889, 2-10.
7. Amaral, G. P., deCarvalho, N. R., Barcelos, R. P., Dobrachinski, F., de Lima Portella, R., da Silva, M. H., Lugokenski, T. H., Mundstock Dias, GR., da Luz, S. C. A., Boligon, A. A., Athayde, ML., Villetti, M. A., Soares, F. A. A. & Fachinetto, R., (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats, *Food and chemical toxicology*, 55, 48-55.
8. Asanova, Zh. K., Suleimenov, E. M., Atazhanova, G. A., Dembitskii, A. D., Pak, R. N., Dar, A. & Adekenov, S. M., (2003). Biological activity of 1, 8-cineole from levant wormwood. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37 (1), 28-30.
9. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5
10. Bubonja-Sonje, M., Jasminka Giacometti, J. & Abram, M., (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1821–1827. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.071
11. Collins, A. R., (2005). Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1923- 1930. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.06.004
12. Cui, S. W., Phillips, G. O., Blackwell, B., & Nikiforuk, J., (2007). Characterisation andproperties of *Acacia senegal* (L.) *Willd.* var. *senegal* with enhanced properties (Acacia (sen) Supergum (TM)): Part 4. Spectroscopic characterisation of *Acacia senegal* var. *senegal* and *Acacia* (sen) Supergum (TM) arabic. *Food Hydrocolloids*, 21(3), 347–352.
13. Dehghan N., Barzegar, H., Mehrnia, M. A., & Jooyandeh, H. 2018. Investigation on the effect of methanolic Bene (P*istachia atlantica*) hull extract on oxidative stability of soybean oil. *Innovative Food Technologies*, 5(3), 499-507. [In Persian].
14. Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R. & Perluigi, M., (2012). Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(5), 737-747. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.005
15. Einbond, L. S., Wu, H. A., Kashiwazaki, R., He, K., Roller, M., Su, T., Wang, X. & Goldsberry, S., (2012). Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia*, 83, 1160-1168.
16. Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E., (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110, 76–82. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.058
17. Esmaeli, F., Tajik, H., Mehdizadeh T., & Mayeli, M., (2017). Determination and comparison of antioxidant activity and phenolic content of *Pimpinella affinis* hydroethanolic extract and essential oil. *The Journal of Urmia University of Medical Sciences*, 28(5), 311-320. [In Persian].
18. Faixovà, Z. & Faix, S., (2008). Biological effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil. *Folia Veterinaria*, 52(3-4), 135-139.
19. Fernandez, J., Zhi, N., Aleson, L., Perez, J. A. & Kuri, V., (2005). Antioxidant and antibacterial activites of natural extracts: application in the beef meat balls. *Meat Science*, 69, 371–380. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.004
20. Gaya, M., Repetto, V., Toneatto, J., Anesini, C., Piwien-Pilipuk, G. & Moreno, S., (2013). Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in Rosmarinus officinalis, is exerted through the C/EBPs and PPARγ pathways at the onset of the differentiation program Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1830(6), 3796- 3806. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.021
21. Haghjoo, L., Barzegar, H., & Jooyandeh, H., (2020). The effect of different drying methods on chemical composition and antioxidant properties of methanolic extract of olive leaf. *Journal of food Science and Technology (Iran)*, 16(97), 149-159. [In Persian].
22. Halliwell, B., (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(pt5), 1147-1150.
23. Halliwell, B., (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 125-30. https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002
24. Hameed, I. H., Ibraheam, I. A. & Kadhim, H. J., (2015). Gas chromatography mass spectrum and fouriertransform infrared spectroscopy analysis of methanolic extract of *Rosmarinus oficinalis* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(6), 90-106.

25. Hendel, N., Larous, L. & Belbey, L., (2016). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. *International Food Research Journal*, 23(4), 1725-1732.
26. Jafarzadeh Khaledi, K., Aghazadeh Meshgi, M., Sharifan, A., & Larijani, K., (2010). Investigation of effect of the Rosemary essential oil on growth of *Staphylococcus aureus* in commercial instant soup. *Journal of Comparative Pathobiology*, 7(2), 255-264. [In Persian].
27. Jalali-Heravi, M., Sadat Moazenia, R. & Sereshtib, H., (2011). Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal of Chromatography*, 1218, 2569–2576. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.048
28. Jamshidi, M., Ashtiani, H. R., Rezazade, S. H., Fathiazad, F., Mazandarani, M. & Khaki, A. (2010). Evaluation and Comparison of phenolic compounds and antioxidant activity of some plant species in mazandaran. *Journal of Medicinal Plants*, 34(2), 177-183.
29. Jamshidi, R., Afzali, Z. & Afzali, D., (2009). Chemical composition of hydrodistillation essential oil of Rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 5 (1), 78-81.
30. Jianga, Y., Wua, N., Jie Fua, Y., Wanga, W., Luoa, M., & Jian Zhaoa, C. H., (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32: 63–68. https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011
31. Johnson, J. J. (2011). Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. Cancer Letters 2011; 305: 1-7. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.02.005
32. Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N. & Ebringerova, A., (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195-203. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X
33. Kak, M., Abdulkadhim, H. M. & Noori, S. I., (2016). Chemical composition and anti-bacterial effects of clove (*Syzygium aromaticum*) flowers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(2), 483-489.
34. Kamkar, A., Shariatifar, N., Jamshidi, A. H., & Mohammadian, M., (2010). Study of antioxidant functional of the water, methanol, and ethanol extracts of Endemic *Cuminum cyminum* L. and *Cardaria draba* L. in the In-vitro Systems. *Internal Medicine Today*, 16(3), 37-45. [In Persian].
35. Kanth, M. K., Mehta, N., Chatli, M. K., Malav, O. P., Kumar, P., Wagh, R. V. & Panwar, H., (2018). In-vitro Assessment of Antimicrobial, Antibiofilm and Antioxidant Potential of Essential Oil from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Animal Research*, 8 (6), 989-998.
36. Kar, S., Palit, S., Ball, WB. & Das, PK., 2012. Carnosic acid modulates Akt/IKK/NF-kB signaling by PP2A and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Apoptosis*, 17, 735-747. https://doi.org/10.1007/s10495-012-0715-4
37. Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N. & Quinn, MT., (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(4), 1749-1770. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.037
38. Kivanc, M. & Akgül, A., (1998). Effect of some essential oil components on the growth of foodborne bacteria and synergism with some food ingredients. *Flavor and Fragrance Journal*, 3, 95-98. https://doi.org/10.1002/ffj.2730030209
39. Lü, J. M., Lin, P. H., Yao Q. & Chen, C., (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840- 860. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x
40. Malakootian, M., & Hatami, B., (2013). Survey of chemical composition and antibacterial activity of *Rosmarinus Officinalis* Essential oils on *Escherichia Coli* and Its Kinetic. *The Journal of Toloo-e-behdasht*, 12(1), 1-13. [In Persian].
41. Melka Abdo, B., Asaminew, G., Mieso, B. & Sisay W., (2018). Chemotypic Characterization and Antioxidant Activities of *Rosemarinus officinalis* Essential Oil from Ethiopian Cultivars. *Medicinal and Aromatic Plants* 7(6), 1-4.
42. Mohammadi, A. R., (2015). Antioxidant effect of methanolic and ethanolic extracts of Salvia officinalis and Rosmarinus officinalis as compare with synthetic antioxidants TBHQ and BHT in oil fish. *MSc. Dissertation*, Islamic Azad University, *Pharmaceutical Sciences Branch*. [In Persian].
43. Mohammadi, T., & Hoveizi, E., (2017). Comparison of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) hydroalcoholic extract on the viability of head and neck cancer cells Line HN5 and neuronal progenitor cells of Mouse. *Quarterly Journal of Developmental Biology*, 9(3), 13-22. [In Persian].

44. Moore, J., Megaly, M., Macneil, A. J., Klentrou, P. & Tsiani, E., (2016). Rosemary extract reduces Akt/mTOR/p70S6K activation and inhibits proliferation and survival of A549 human lung cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 83,725-32. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.043
45. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S. & Vojnov, A. A., (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40, 223-231.
46. Naji Tabasi, S. & Razavi, S. M. A., 2016. New studies on basil (*Ocimum bacilicum* L.) seed gum: Part 2–Emulsifying and foaming characterization. *Carbohydrate Polymers*, 149, 140-150. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.088
47. Newman, D. J., Cragg ,G. M. & Snader, K. M., (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022- 1037.
48. NGO, S. N. T., Williams, D. B. & Head, R. J., (2011). Rosemary and cancer prevention: Preclinical perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 946-954.
49. Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C. H., Bekele, J. & Hassanali, A., (1997). Biological activity of 1, 8- cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyese* (ayobagira) against stored products beetles. *Journal of Applied Entomolog*, 121 (2), 237-243. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1997.tb01399.x
50. Petiwala, S. M. & Johnson, J. J., (2015). Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer letters*, 367(2), 93-102. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.005
51. Petti, S. & Scully, C., (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, 37, 413-423. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.02.003
52. Pourmorad, F., Hosseinmehr, S. J. & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some slected Iranian medicinal plants. *Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.
53. Prochazkova, D., Bousova, I. & Wilhelmová N., (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513- 523. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018
54. Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S. & Horax. R., (2004). Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-Butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5183-5186. https://doi.org/10.1021/jf049645z
55. Rahman, K., (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236.
56. Rodrigues, S. E., Machado, A. E. H., Berardi, M., Ito, AS., Almeida, L. M., Santana, M. J. Liao, L. M., (2015). Investigation of protonation effects on the electronic and structural properties of halogenated sulfonated porphyrins. *Journal of Molecular Structure*, 1084, 284–293. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.12.053
57. Roomiani, L., Soltani, M., & Akhondzadeh Basti, A., (2016). Effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil and nisin on Log P% of *Streptococcus iniae* in BHI broth. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 10(1), 35-43. [In Persian].
58. Sampaio, R. N., Gomes, W. R., Araujo, D. M. S., Machado, A. E. H., Silva, R. A., Marletta, A., Borissevitch, A. S., Dinelli, Batista, AA., Zílio, SC., Gonçalves, PJ, & Barbosa Neto., NM. (2012). Investigation of Ground- and Excited-State Photophysical Properties of 5,10,15,20-Tetra (4-pyridyl)- 21H, 23H-porphyrin with Ruthenium Outlying Complexes. *The Journal of Physical Chemistry*, 116, 18-26. https://doi.org/10.1021/jp205963k
59. Santos, F. A., Silva, R. M., Campos, A. R., de Araújo, R. P., Lima Júnior, R. C. P. & Rao, V. S. N., (2004). 1, 8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food and Chemical Toxicology*, 42 (4), 579-584. https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.11.001
60. Santos, R. D., Shetty, K., Cecchini, A. L. & Miglioranza, L. H. S., 2012. Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. Semina: Ciências Agrárias, 33(2), 655-666.
61. Selmi, S., Rtibi, k., Grami, D., Sebai, H. & Marzouki, L., 2017. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil components exhibitanti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects inexperimental diabetes. *Pathophysiology*, 915: 1-7. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.08.002
62. Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C. M. & Wall, D, S., (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99, 478–83. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.009
63. Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. & Corke, H., (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749-7759. https://doi.org/10.1021/jf051513y
64. Soltani, M., Ghodratnama, M., Ebrahimzadeh-Mosavi, H. A., Nikbakht-Brujeni, G., Mohamadian, S. & Ghasemian, M., (2014). Shirazi thyme (*Zataria multiflora Boiss*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils repress expression of sagA, a streptolysin S-related gene in Streptococcus iniae. *Aquaculture*, 430, 248-252. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.012

65. Wang, S., Meckling, K. A., Marcone, M. F., Kakuda, Y. & Tsao, R., (2011). Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents. *Food Research Internationa*, 44(9), 2545- 2554. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.021
66. Wojdyło, A., Oszmianskii, J. & Czemerys, R., (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038
67. Yesil-Celiktas, O., Bedir, E. & Vardar Sukan, F., (2007). In vitro antioxidant activities of Rosmarinus officinalis extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 101, 1457-1464. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.055
68. Yesil-Celiktas, O., Girgin, G., Orhan, H., Wichers, H. J., Bedir, E. & Vardar-Sukan, F., (2007b). Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *European Food Research and Technology*, 224,443-51. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.021
69. Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E. & Vardar-Sukan, F., (2010b). Inhibitory effects of rosemary cxtracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human Cancer Cell Lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 158-163. https://doi.org/10.1007/s11130-010-0166-4
70. Young, IS. & Woodside, J., (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176- 186.